Université Libre de Bruxelles
Faculté de Médecine

Biophysique

Travaux pratiques de laboratoire

version du 28 novembre 2012

David Gall

Année académique 2012-2013

Objectifs

Nous proposons une série de quatre séances de travaux pratiques ayant pour ambition de vous permettre d'appréhender de manière concrète les notions physiques de bases en électricité et leur application à la compréhension de la physiologie des tissus excitables. Les séances de travaux pratiques sont centrées sur la mise en évidence expérimentale, à l'échelle moléculaire, du courant unitaire produit par un canal ionique. Le choix de cette manipulation expérimentale repose sur le fait que c'est l'existence de ces protéines spécialisées qui permet d'expliquer les propriétés particulières des cellules excitables. Dès lors, nous voulons vous permettre d'approcher directement cette thématique qui est essentielle au niveau du cours théorique. Au travers de trois séances de laboratoire, nous aborderont successivement :

- **Laboratoire I** : la mesure et l'instrumentation. Il s'agit d'une séance d'introduction aux différents appareils nécessaires à la mise en évidence expérimentale du courant unitaire produit par un canal ionique (oscilloscope, générateur de fréquences) et à leur utilisation dans le cadre de mesures de caractéristiques électriques de circuits résistifs linéaires et non linéaires (résistance, ampoule et diode).
- **Laboratoire II** : propriétés passives et actives de la membrane cellulaire. Il s'agit, à l'aide des instruments déjà présentés, d'analyser le comportement électrique de circuits équivalents simulant les propriétés électriques passives de la membrane cellulaire (charge et décharge du condensateur, notion de constante de temps, circuit simulant la réponse passive d'un axone, notion de constante d'espace) et d'étudier le comportement d'un circuit actif (amplificateur).
- **Laboratoire III** : canaux ioniques. Vous serez amenés à réaliser une bi-couche lipidique artificielle et à y insérer des canaux ioniques (gramicidine A) afin d'observer les courants unitaires produits par l'ouverture et la fermeture de ces canaux. Au travers de cette expérience, vous pourrez appréhender concrètement les notions de théorie des circuits dans un cadre biologique.

– **Laboratoire IV** : potentiel d'action et excitabilité. Il s'agit d'étudier l'approche expérimentale, basée sur la technique du potentiel imposé, qui est à la base de la compréhension du mécanisme permettant la génération des potentiels d'action. De plus, les lois de l'excitation nerveuse, découvertes empiriquement au début du vingtième siècle, régissant l'apparition des potentiels d'action dans un axone sont également mises en évidence dans cette séance. Ces différents aspects seront abordé au travers de la réalisation de simulations numériques basées sur le modèle de Hodgkin et Huxley.

Laboratoire I : la mesure et l'instrumentation

1.1 Introduction

Il s'agit d'une séance d'introduction aux différents appareils nécessaires à la mise en évidence de différences de potentiel et de courants et à leur utilisation dans le cadre de mesures de caractéristiques électriques de circuits résistifs linéaires et non linéaires (résistance, ampoule et diode) en courant continu.

1.1.1 Prérequis

Afin de préparer cette séance de travaux pratiques, vous devez revoir les sections § 3.2, § 5.2.2 et § 5.2.3 du syllabus.

1.1.2 Objectifs de la séance de laboratoire n°1

- Apprendre à utiliser le multimètre pour mesurer respectivement le courant I traversant un conducteur et la différence de potentiel V aux bornes d'un conducteur.
- Mesurer les caractéristiques $I(V)$ de différents conducteurs et observer que certains obéissent à la loi d'Ohm, alors que d'autres on un comportement différent.
- Apprendre à monter deux résistances en série, en parallèle et en diviseur de tension, à prévoir la caractéristique de ce circuit et à contrôler expérimentalement le modèle théorique.

1.2 Matériel

- cinq éléments résistifs passifs : trois résistances R_1, $R_2/2$ et R_2, une ampoule à filament (12V) et une diode.

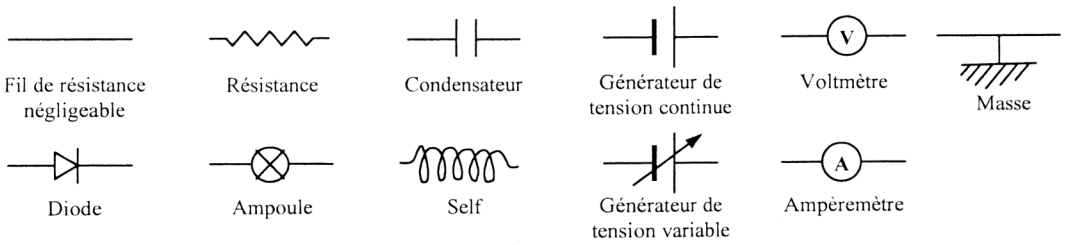


FIGURE 1.1 – Symboles électriques. Symboles couramment utilisés dans les schémas électriques

---

- Une alimentation combinée. composée d'un générateur de tension continue ou alternative $V(t)$
- Un multimètre digital

1.2.1 Précautions d'usage

Deux précautions importantes doivent être respectées lors des mesures électriques pour ne pas endommager les équipements :

- vous effectuez les câblages **hors tension** et demandez le passage de l'enseignant **avant** la mise sous tension.
- Lors d'une mesure de courant avec un multimètre, il convient impérativement de ne pas dépasser le courant à fond d'échelle. A priori, vous ne connaissez pas l'ordre de grandeur de la variable à mesurer. Dans ce cas, il faut commencer la mesure en prenant l'échelle la moins sensible.

1.2.2 Mode d'emploi de l'alimentation combinée

Le générateur de tension continue : POWER SUPPLY

Cet appareil constitue la partie inférieure droite de l'alimentation combinée (fig. 1.2) . Il sera utilisé comme générateur de tension continue. Il est muni d'un bouton "POWER" (*38*) possédant deux positions "ON" et "OFF". Il comporte deux sorties à tension constante : 5 V et 15 V ; ainsi qu'une sortie à tension variable, 0 à 30 V (*42, 43 et 44*). Chaque sortie est caractérisée par une borne positive (en rouge) et une borne négative (en noir). Lors de l'utilisation de la sortie variable 0 - 30 V, le réglage de tension s'effectue à l'aide du bouton "VOLTAGE" (*39*). La différence de potentiel ainsi obtenue est affichée sur l'écran incorporé dans l'appareil (*37*). Cette valeur est cependant trop peu précise pour être utilisée dans vos mesures. Cet appareil peut aussi

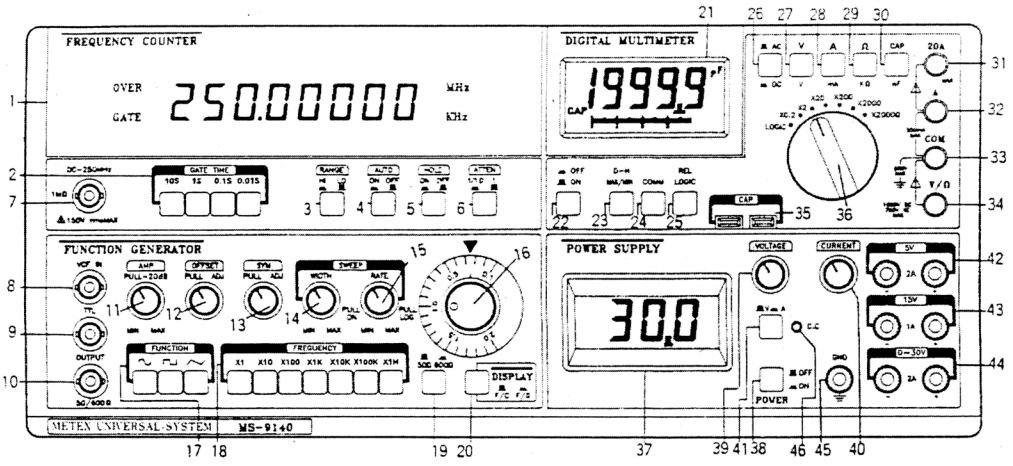


FIGURE 1.2 – Schéma de l'alimentation combinée

être utilisé comme générateur de courant, le bouton *41* est alors enfoncé. Les autres fonctions ne seront pas utilisées et ne sont donc pas détaillées à ce stade.

Le multimètre : DIGITAL MULTIMETER

Cet appareil constitue la partie inférieure droite de l'alimentation combinée. Il est muni d'un bouton "POWER" possédant deux positions "ON" et "OFF" (*22*). Les informations données ci-dessous sont également valables pour l'autre multimètre qui est à votre disposition (boîtier jaune). Comme son nom l'indique, cet appareil permet différents types de mesures : intensité de courant et différence de potentiel (continu, DC, ou alternatif, AC), résistance et capacité. La sélection du type de mesure (*26 à 30*), ainsi que l'échelle (*36*), doit se faire avant de commencer la mesure. Pour la mesure d'une capacité, les bornes du condensateur sont reliées au multimètre dans les entrées spécifiques (notées "CAP" (*35* ou Cx). Pour toutes les autres mesures, une borne est connectée à l'entrée de référence, notée "COM" (*33*) et l'autre à l'entrée adéquate suivant la mesure à effectuer (*31, 32 ou 34*).

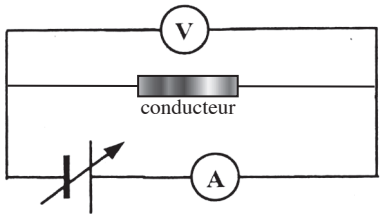


FIGURE 1.3 – Mesure de la résistance.

1.3 Mesures

1.3.1 Contrôle de la source de tension variable

Connectez le voltmètre aux bornes du générateur de tension variable 0-30 V de l'alimentation (attention aux polarités !). Choisissez l'échelle appropriée sur le voltmètre. Faites varier la tension ("VOLTAGE") et vérifiez à l'aide du voltmètre l'exactitude de la valeur affichée sur l'écran du générateur de tension.

1.3.2 Mesures des caractéristiques de différents conducteurs

- Réalisez le montage proposé (fig. 1.3) en utilisant le multimètre de l'alimentation combinée comme ampèremètre (entrée 20 A et utilisation du bouton *36* en position x20000) et le multimètre indépendant comme voltmètre.
- Faites vérifier votre montage
- Mesurez successivement pour chacun des quatre éléments passifs (R_1, $R_2/2$, ampoule et diode) vingt paires de valeurs de I et V sur une plage de tension allant de -10 V à 10 V maximum (sauf pour la diode, entre -2 V et 1 V maximum), en prenant plus de points quand le courant varie fortement pour de faibles variations de la différence de potentiel.
- Portez vos mesures dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- Mesurez les résistances R_1 et $R_2/2$ à l'aide de l'ohmmètre. Pour comparez les valeurs obtenues par vos mesures à celles obtenues en mesurant ces résistances avec l'ohmmètre.

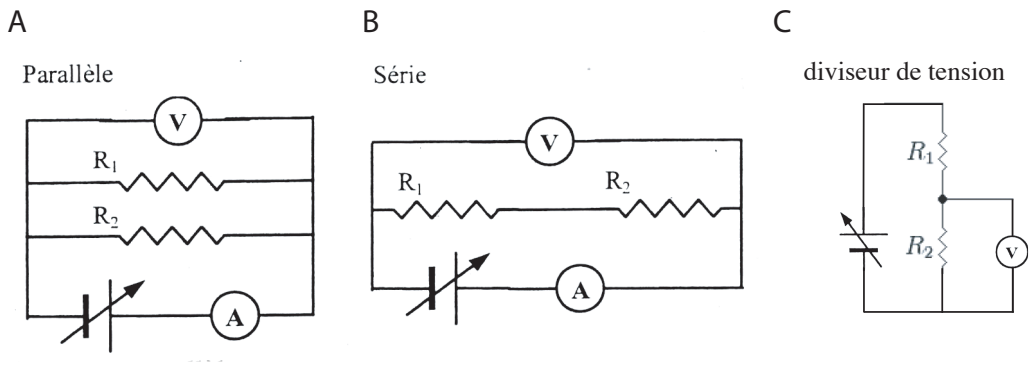


FIGURE 1.4 – Montages.

1.3.3 Montage en parallèle, en série et diviseur de tension

- Réalisez les montages A et B tels que proposés (fig. 1.4).
- Mesurez le courant traversant le circuit pour une dizaine de valeurs de la différence de potentiel (de -10 V à 10 V maximum).
- Portez vos mesures dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- Réalisez le montage C (fig. 1.4).
- Mesurez la différence de potentiel aux bornes de R_2 pour trois valeurs de la différence de potentiel (de -10 V à 10 V maximum). Refaites cette mesure en remplaçant la résistance R_2 par $R_2/2$. Mesurez la valeur de R_2 avec l'ohmmètre. Calculez le gain en tension pour les deux valeurs de résistances R_2 et $R_2/2$.
- Portez vos mesures dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- Sur le montage correspondant à la figure 1.4.C, connectez la résistance variable R_3 en parallèle aux bornes de R_2. Mesurez le potentiel aux bornes de R_3. Calculez le gain en tension correspondant pour R_3 en position 3, position 6 et position 11. Mesurez les résistances correspondant aux trois positions de R_3 utilisées à l'aide de l'ohmmètre.

1.4 Questions

- Parmi les quatre éléments étudiés, lesquels ont un comportement ohmique
- Peut on parler de la résistance d'une ampoule ? Si oui dans quelles conditions ?
- Peut on parler de la résistance d'une diode ? Si oui dans quelles conditions ?
- Concernant les montages en parallèle, en série et en diviseur de tension (avec les deux valeurs de R_2), vos résultats sont-ils en accord avec la théorie ?
- Expliquez l'effet que vous observez vous en faisant varier R_3 dans le dernier montage ?

Laboratoire II : propriétés passives et actives de la membrane cellulaire

2.1 Introduction

L'objectif de cette séance est de vous familiariser avec la mesure de signaux électriques qui évoluent au cours du temps. Dans ce but, vous apprendrez a utiliser un oscilloscope qui est un instrument de base dans tout laboratoire de physiologie.

2.1.1 Prérequis

Afin de préparer cette séance de travaux pratiques, vous devez revoir le chapitre 4 et la section 5.2 du syllabus.

2.1.2 Objectifs de la séance de laboratoire n°2

- Apprendre à utiliser l'oscilloscope pour mesurer une différence de potentiel V qui varie au cours du temps
- Etudier le comportement d'un circuit RC soumis à un signal périodique carré.
- Etudier le comportement d'un circuit RC utilisé comme filtre passe-bas.
- Etudier le comportement d'un circuit simulant la réponse passive d'un axone à un stimulus de faible intensité.
- Etudier le comportement d'un amplificateur opérationnel.

2.2 Matériel

- Une alimentation combinée

- Un oscilloscope.
- Une résistance, un condensateur variable, un circuit simulant la réponse passive d'un axone et un amplificateur opérationnel.

2.2.1 Mise à la terre

Comme nous l'avons vu au cours, la masse est le point de potentiel de référence à 0 V par convention. Le fait de raccorder la masse à la terre fixe le potentiel de ce point et assure une protection vis-à-vis d'éventuelles fuites de courant. La sonde de l'oscilloscope comporte un contact "à la masse". Prenez garde, dans vos différents montages, de connecter tous les contacts "à la masse" ensemble en un seul point. Ne pas le faire risquerait de mener à des court-circuits et à des mesures incorrectes.

2.2.2 Mode d'emploi de l'alimentation combinée

Les nombres en italiques se réfèrent à la figure 1.2.

Le générateur de fonction : FUNCTION GENERATOR

Cet appareil constitue la partie inférieure gauche de l'alimentation combinée. La mise sous tension de cet appareil s'effectue en deux étapes, il faut d'abord allumer l'appareil à l'aide du bouton "ON/OFF" correspondant à l'arrière du boîtier et ensuite utiliser le bouton "POWER" (*38*) du générateur de tension continue. Cet appareil est utilisé comme générateur de signaux alternatifs. La sortie du signal se fait à l'aide d'un câble de type BNC (câble coaxial de type "British National Cable") qui sera connecté en "OUTPUT" (*10*). Vous devez choisir les caractéristiques de votre signal, à savoir :

- Sa forme : "FUNCTION" (*17*)
- Son amplitude : "AMP" (*11*) qui est un bouton non gradué. Il vous faut donc utiliser l'oscilloscope pour connaître l'amplitude du signal de sortie.
- Sa fréquence : les sept boutons "FREQUENCY" (*18*) permettent de choisir une plage de fréquence (par exemple, "X10", donne accès à des fréquences allant de 1 à 18 Hz). Le vernier (*16*) permet le réglage fin dans la plage choisie. La fréquence sélectionnée peut être lue directement sur le fréquencemètre.

Les autres fonctions ne seront pas utilisées au laboratoire. Veillez cependant à ce que la sortie se fasse en 50 Ω (bouton *19* non enfoncé) et à ce que le bouton "DISPLAY" soit en position enfoncée.

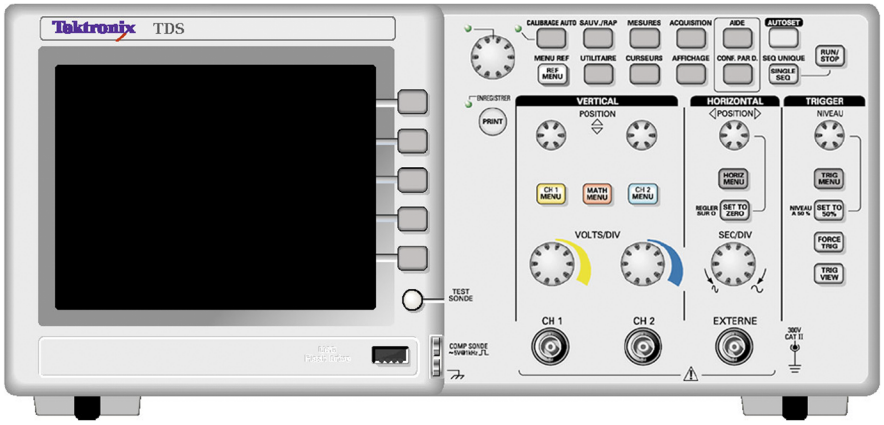


FIGURE 2.5 – Panneau avant de l'oscilloscope. A droite de l'écran, on distingue les deux connecteurs d'entrée CH1 et CH2, les réglages verticaux (amplitude) pour les deux canaux, le réglage horizontal (base de temps) et le réglage du déclenchement ("trigger").

2.2.3 Mode d'emploi de l'oscilloscope

Voici la description des principales fonctions de l'oscilloscope que vous allez être amené à utiliser au laboratoire. Le panneau avant de l'appareil est illustré à la figure 2.5. La mise sous tension de l'appareil se fait à l'aide du bouton "0/I" situé au dessus de l'appareil. Un oscilloscope sert a mesurer des différences de potentiel variables au cours du temps (signaux).

Ecran

L'écran de l'oscilloscope est illustré à la figure 2.6. Il s'agit ici d'un oscilloscope à deux canaux, c-à-d que l'on peut observer simultanément deux signaux, l'un provenant de l'entrée CH1 et l'autre de l'entrée CH2. Dans le cadre de ces travaux pratiques, les seuls paramètres utiles sont les facteurs d'échelle de l'amplitude pour chacun des canaux (8), la base de temps. (10) et les marquers indiquant les point de référence de masse des signaux affichés (6).

Réglages verticaux

La déviation verticales des traces permet de mesurer l'amplitude des signaux. Les réglages suivants (fig. 2.7.) vous seront utiles :

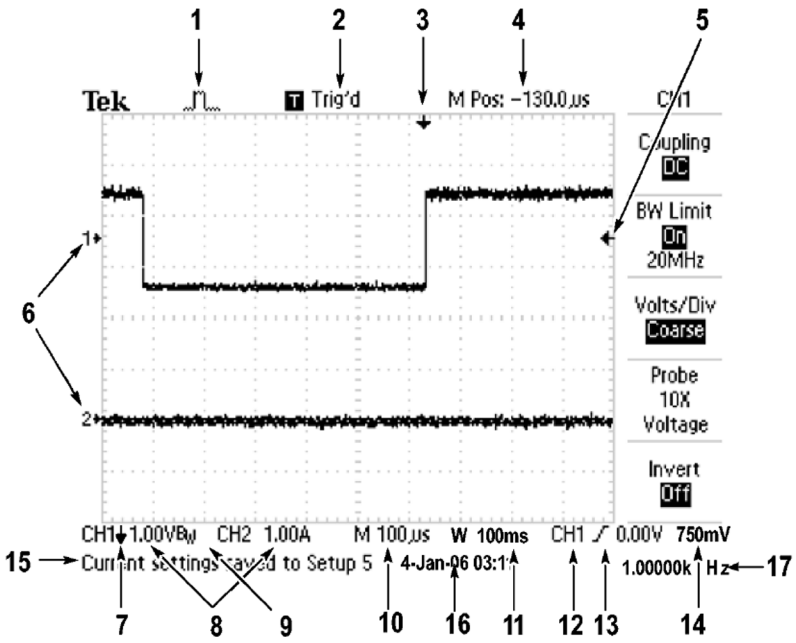
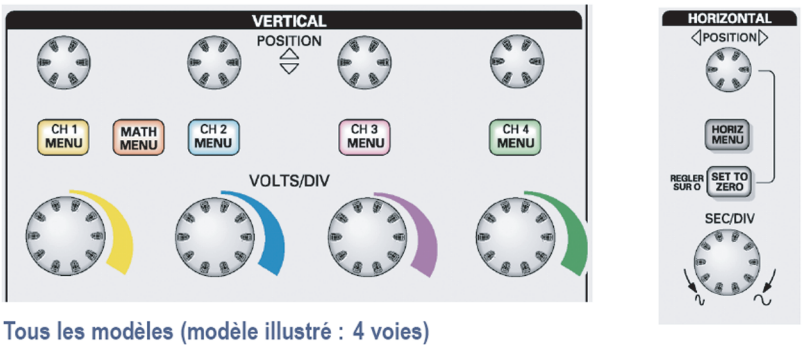


FIGURE 2.6 – Ecran de l'oscilloscope. L'écran affiche les deux traces correspondant au deux entrées CH1 et CH2 ainsi que de nombreux paramètres de réglages.



Tous les modèles (modèle illustré : 4 voies)

FIGURE 2.7 – Panneau des réglages verticaux (à gauche) et horizontaux (à droite).

- **POSITION CH1 et CH2** : positionne un signal verticalement.
- **CH1 et CH2 MENU** : permet d'afficher les options du menu vertical et d'activer et de désactiver l'affichage du signal provenant du canal correspondant.
- **VOLTS/DIV** : permet de sélectionner les facteurs d'échelle verticaux. Par exemple, la position 2 V signifie qu'une division verticale, c-à-d la hauteur d'un carré à l'écran, correspond à 2 V.

Réglages horizontaux

La déviation horizontale sert à mesurer le temps. Les réglages suivants vous seront utiles :

- **POSITION** : permet de régler la position horizontale de tous les signaux.
- **HORIZ MENU** : permet d'afficher les options du menu horizontal.
- **SEC/DIV** : permet de sélectionner le facteur de temps pour les deux canaux. Par exemple, la position 1 ms signifie qu'une division horizontale, c-à-d la largeur d'un carré à l'écran, correspond à 1 ms.

2.3 Mesures

2.3.1 Maniement de l'oscilloscope

Connectez la sortie du générateur de fonctions à l'entrée CH1 de l'oscilloscope. Observez les signaux obtenus sur l'écran de l'oscilloscope en faisant varier les caractéristiques choisies sur le générateur de sinaux, à savoir : la forme ("FUNCTION" (*17*)), l'amplitude :("AMP" (*11*)) et la fréquence (les sept boutons "FREQUENCY" et le vernier (*16*)). Entraînez-vous à mesurer l'amplitude de chacun des signaux ainsi que leur forme, fréquence et période. Mesurez le signal envoyé sur le câble labo et spécifiez le type de signal (carré, triangle,...) ainsi que sa fréquence et son amplitude dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.

2.3.2 Etude du circuit RC

- Effectuez le montage tel qu'illustré à la figure 2.8 avec la résistance variable en position 9 et le condensateur variable en position 5. Placez un connecteur BNC en "T" à la sortie du générateur de fonctions et connectez une sortie à l'entrée CH1 de l'oscilloscope et l'autre à l'entrée du circuit RC, c-à-d entre les points O et W du schéma (à l'aide du câble avec un connecteur BNC à une extrémité et deux fiches à l'autre

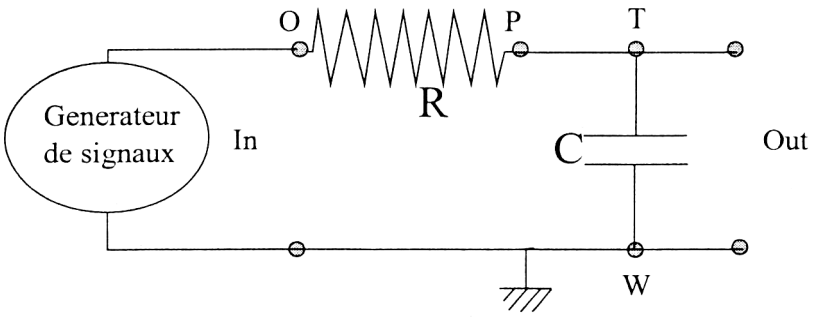


FIGURE 2.8 – Schéma du circuit RC.

extrémité). Connectez la sonde de l'oscilloscope à la sortie du circuit RC, c-à-d entre les points T et W du schéma, et à l'entrée CH2 de l'oscilloscope.
- Faites vérifier votre montage
- à l'entrée du circuit, imposez un signal de forme carrée dont vous choisissez la fréquence de façon à bien voir la charge et la décharge du condensateur sur une période.
- Réglez l'oscilloscope de façon à visualiser la décharge du condensateur avec une précision maximale. Relevez à l'écran les coordonnées de la courbe de décharge, $V(t)$. Portez vos mesures dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.

2.3.3 Le circuit RC comme filtre

Comme nous l'avons vu au cours, le circuit RC peut être utilisé comme un filtre en fréquence atténuant les hautes fréquences mais pas les basses fréquences.

- à l'entrée du circuit, imposez un signal de forme sinusoïdale dont vous réglez l'amplitude au maximum et la fréquence au minimum. Faites ensuite augmenter la fréquence sans modifier le réglage d'amplitude et observez l'amplitude du signal de sortie. Relever une dizaine de valeurs d'amplitude pour des valeurs de fréquences croissantes de façon à couvrir l'entièreté de la plage de fréquence disponible sur le générateur.
- Calculez le gain en tension pour chaque fréquence et portez vos mesures dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.

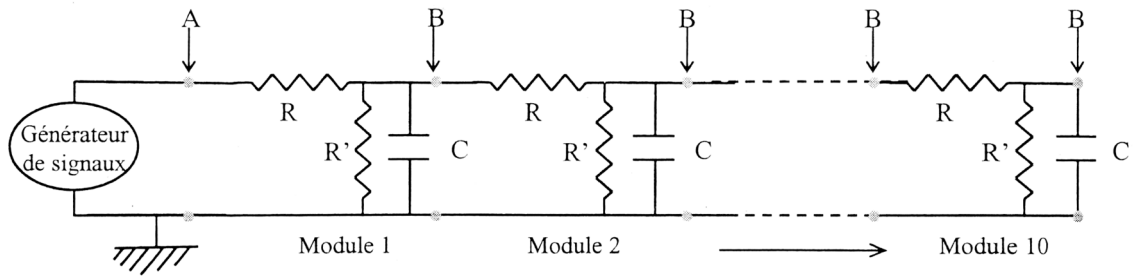


FIGURE 2.9 – Schéma du circuit équivalent de l'axone.

2.3.4 Propriétés passives et circuit équivalent de l'axone

Comme nous l'avons vu au cours, l'axone non myélinisé peut être comparé à un cable électrique mal isolé dans des conditions où les valeurs de potentiel membranaire ne permettent pas l'activation des canaux potentiel dépendants.

Dans ces conditions, on peut caractériser l'axone par une résistance longitudinale, une résistance de membrane et les propriétés capacitives des parois. On définit la constante de longueur λ comme étant la longueur de la fibre nerveuse telle que la résistance longitudinale est égale à l arésistance de membrane, c-à-d que sur cette longueur la même quantité de courant aura parcouru la fibre et traversé la paroi.

La figure 2.9 représente le schéma équivalent d'un axone décrivant ses propriétés électriques passives. Dans ce schéma, l'axone a été divisé en petits modules élémentaires de résistance R et R' et de capacité C, dans lesquels R représente la résistance longitudinale (ou axoplasmique), R' la résistance transversale (ou membranaire) et C la capacite d'un élément de membrane. Dans le cadre de ce circuit équivalent, la constante de longueur sera exprimée en terme de nombre de modules. Dans chaque module, $R = 470\Omega$,$R' = 1200\Omega$ et $C = 0.5\mu F$.

- Effectuez le montage tel qu'illustré à la figure 2.9, placez un connecteur BNC en "T" à la sortie du générateur de fonctions et connectez une sortie à l'entrée CH1 de l'oscilloscope et l'autre à l'entrée du circuit, c-à-d entre les points A et la 'terre" du schéma (à l'aide du câble avec un connecteur BNC à une extrémité et deux fiches à l'autre extrémité).
- à l'entrée du circuit, imposez un signal de forme carrée dont la fréquence est d'environ $100Hz$.
- Observez la différence de potentiel aux bornes des différents modules à l'aide de la sonde de l'oscilloscope connectés à l'entrée CH2 de l'appa-

reil (attention : respectez la convention pour le potentiel de référence utilisée en électrophysiologie)
- Mesurez, pour chacun des dix modules, les valeurs des différences de potentiel maximales atteintes et portez vos mesures dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.

2.3.5 Amplification

Vous allez étudier le comportement d'un circuit actif, il s'agit ici d'un amplificateur non inverseur dont les bornes d'alimentation externes sont à + 9 V et -9 V (piles situées dans le boîtier).

- Mettez l'interrupteur de l'amplificateur sur ON
- Connectez le connecteur BNC en "T" à la sortie du générateur de fonctions à l'entrée CH1 de l'oscilloscope et l'autre à l'entrée de l'amplificateur (IN générateur)
- Réglez le générateur de signaux sur un signal de forme sinusoïdale d'amplitude minimale et de fréquence d'environ 100 Hz.
- Observez la différence de potentiel à la sortie de l'amplificateur à l'aide de la sonde de l'oscilloscope connectés à l'entrée CH2.
- Réglez l'amplificateur sur un gain supérieur à 1 à l'aide du bouton Pot.
- Vous allez mesurer l'amplitude du signal de sortie en fonction de l'amplitude du signal d'entrée. Portez vos mesures dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.

2.4 Questions

Expliquez les points suivant dans le rapport :
- Dans le cadre de l'étude du circuit RC, justifiez par calcul votre choix de fréquence pour le signal carré.
- Dans le cadre de l'étude du circuit RC, expliquez pourquoi $ln\ V(t)$ est linéaire et comparez la valeur de la constante de temps obtenue par vos mesures à celles obtenue en mesurant la résistances et la capacité avec le multimètre.
- Dans le cadre des mesures sur le circuit RC comme filtre, calculez la bande passante à 3 dB théorique et comparez avec vos résultats.
- Dans le cadre des mesures réalisées sur le circuit équivalent de l'axone, comparez la valeur de λ obtenue par vos mesures à la valeur théorique $\sqrt{R'/R}$.

– Dans le cadre des mesures réalisées avec l'amplificateur, expliquez ce que vous observez pour les grandes valeurs de l'amplitude d'entrée et interprétez ce résultat.

Laboratoire III : Canaux ioniques

3.1 Introduction

L'existence d'une différence de potentiel transmembranaire et l'excitabilité trouvent leur origine dans deux propriétés cellulaires :

- une perméabilité membranaire sélective pour certaines espèces ioniques liée à l'existence de canaux ioniques.
- l'existence de gradients ioniques transmembranaires entretenus par la cellule.

Les canaux ioniques constituent une cible pharmacologique importante et peuvent également être liés à certaines pathologies (myasthénie, mucoviscidose,...)

L'objectif de cette séance est de vous permettre appréhender concrètement la notion de potentiel d'équilibre ainsi que la théorie des circuits dans un cadre biologique par la mise en évidence expérimentale des courants unitaires produits par l'ouverture et la fermeture d'un canal ionique. Cette séance a été conçue et réalisée en collaboration avec Vadim Shlyonsky et Freddy Dupuis.

3.1.1 Prérequis

Afin de préparer cette séance de travaux pratiques, vous devez revoir la section § 3.3 du syllabus. Une vidéo présentant le matériel et l'expérience à réaliser est également disponible dans l'Université Virtuelle.

3.1.2 Objectifs de la séance de laboratoire n°3

- Etudier le comportement d'un circuit RC en parallèle soumis à un signal périodique triangulaire
- Etudier le comportement d'une bicouche lipidique artificielle soumise à un signal périodique triangulaire

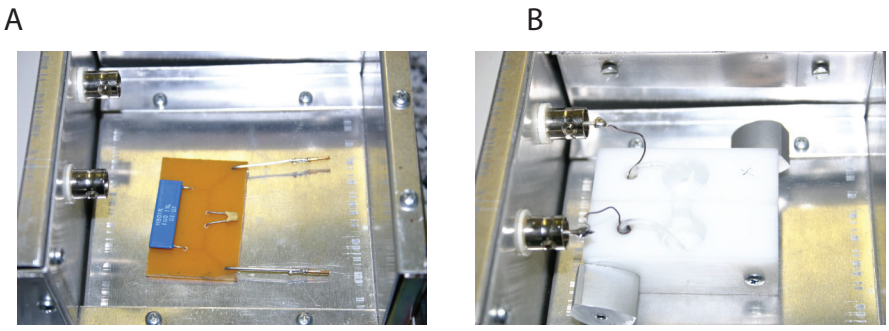


FIGURE 3.10 – Matériel lié à l'étude des bicouches lipidiques artificielles. (A) Circuit RC équivalent à un élément de membrane, comportant une résistance 1 $G\Omega$ et un condensateur de 220 pF. Le circuit est muni de deux connecteurs à insérer dans l'amplificateur. (B) Chambre expérimentale permettant la reconstitution d'une bicouche lipique artificielle. Elle comporte deux compartiments, remplis de NaCl 1M, séparés par un film de téflon percée d'un trou. La chambre est munies de deux électrodes Ag/AgCl connectés à l'amplificateur.

– Mettre en évidence les courant unitaires produit par un canal ionique (gramicidine)
– Etudier le comportement ohmique de ce canal en présence de gradients ioniques différents.

3.2 Matériel

La mise en évidence du courant unitaire produit par un canal ioniques dans une bicouche lipidique artificielle sera réalisée à l'aide du matériel suivant :

– un amplificateur permettant la mesure du courant en potentiel imposé (gain réglable 1, 10 et 100 mV/pA) muni d'un filtre passe-bas de fréquence de coupure variable (1000 Hz, 100 Hz et 16 Hz)
– un circuit équivalent d'un élément de membrane comportant une résistance 1 $G\Omega$ et un condensateur de 220 pF (fig. 3.10.A)
– une chambre comportant deux compartiments, remplis de NaCl 1M,

séparés par un film de téflon percée d'un trou. La chambre est munies de deux électrodes Ag/AgCl pour la connexion à l'amplificateur (fig. 3.10.B).
- un oscilloscope (pré-réglé pour la mesure initiale : base de temps 1 ms/DIV, CH1 : 2 mV/DIV, CH2 : 2 V/DIV, mode DC sur les deux canaux).
- un générateur de signaux (configuré pour fournir le signal triangulaire demandé)
- une source de tension continue variable ($\Delta V = \pm 120mV$)
- une interface NI USB 6008 permettant la conversion numérique du signal avec une précision de 12 bits dans un intervalle de -10 V à +10 V.
- deux pipettes (1 ml et 10 μl)
- une solution contenant un lipide (3-sn-phosphatidylcholine) dilué dans du n-octane (20 mg/ml)
- une solution stock de 1 nM de gramicidine. La gramicidine A forme des canaux ioniques sélectif pour les ions monovalents positifs (fig. 3.12.A).

3.3 Mesures

3.3.1 Bicouche lipidique artificielle et courants unitaires

- connectez le circuit RC aux bornes de l'amplificateur (Gain 1 mV/pA, filtre passe-bas 1000 Hz)
- Allumez le générateur de signaux et, à l'aide de l'oscilloscope, vérifiez que vous imposez un potentiel triangulaire dont la fréquence est de 500 Hz et l'amplitude 10 mV (peak to peak)
- Observez le courant traversant le circuit et utilisez ce résultat pour estimer la capacité du circuit test. Indiquez cette valeur dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- Placez l'interrupteur situé à l'arrière de la source de tension en position haute. Mesurez la résistance du circuit à l'aide du générateur de tension continue ($\Delta V = \pm 120mV$, oscilloscope CH2 sur 100 mV/div, ampli sur gain 1 mV/pA et filtre passe-bas sur 16 Hz). Indiquez la résistance du circuit test dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- connectez la chambre aux bornes de l'amplificateur (fig 3.11.A)
- imposez un potentiel triangulaire dont la fréquence est de 500 Hz et l'amplitude 10 mV (peak to peak)
- prélevez 2 μl de la solution de lipide et injectez la près du trou entre les

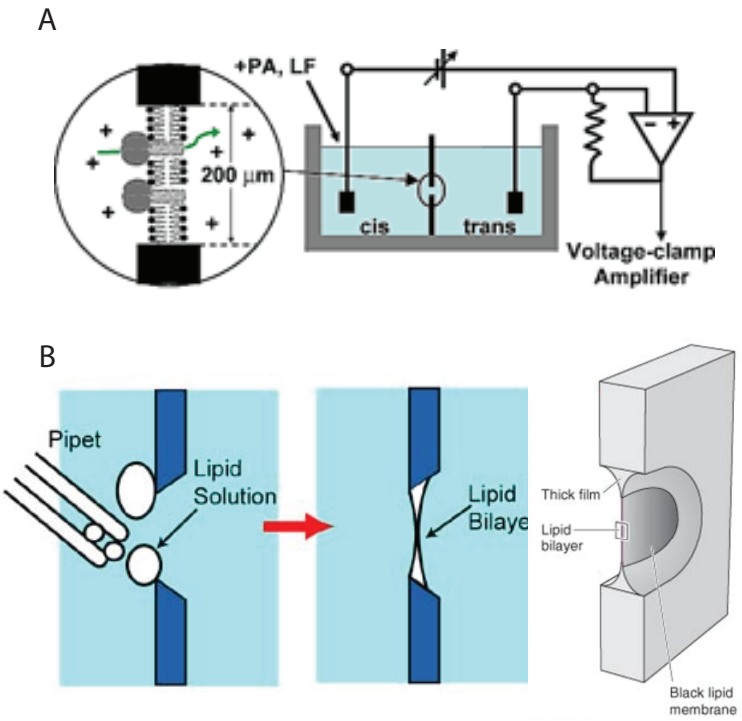


FIGURE 3.11 – Schéma du dispositif expérimental. (A) La bicouche est obtenue au niveau du trou séparant les deux compartiments. L'amplificateur mesure le courant traversant la bicouche tout en imposant une différence de potentiel entre les deux compartiments (technique du potentiel imposé). (B) Reconstitution d'une bicouche lipidique artificielle. La bicouche est obtenue en injectant une petite quantité de lipides au niveau du trou situé dans le film en téflon séparant les deux compartiments.

2 compartiments (fig 3.11.B) et observez le courant (Gain 1 mV/pA, filtre passe-bas 1000 Hz). Lorsque l'amplitude du signal est stable, enregistrez le courant à l'aide de l'ordinateur et de l'interface NI USB 6008, pour cela utilisez l'application *nidatalogger* et choisissez une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz. Vos mesures apparaitront sous forme d'un fichier Excel situé dans /Documents/LabView Data. Renommez ce fichier en `capacitance.xls`

- Grâce à la calibration réalisée précédement avec le circuit test, évaluez la capacité de la bicouche lipidique. Vous devez obtenir une membrane dont la capacité est de l'ordre 200 pF. Sachant que la capacité spécifique d'une bicouche lipidique est de l'ordre de 1 $\mu F/cm^2$, estimez le rayon de la bicouche à partir du signal observé. Indiquez la capacité et le rayon de votre bicouche lipique dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- Placez l'interrupteur situé à l'arrière de la source de tension en position haute. Mesurez la résistance de la bicouche à l'aide du générateur de tension variable ($\Delta V = \pm 120mV$, oscilloscope CH2 sur 100 mV/div, ampli sur gain 100 mV/pA et filtre passe-bas sur 16 Hz). Vous devez obtenir une membrane telle que la résistance observée est de l'ordre 100 $G\Omega$. Enregistrez le courant à l'aide de l'ordinateur et de l'interface NI USB 6008, pour cela utilisez l'application *nidatalogger* et choisissez une fréquence d'échantillonnage de 100 Hz. Vos mesures apparaitront sous forme d'un fichier Excel situé dans /Documents/LabView Data. Renommez ce fichier en `resistance.xls` . A partir de cette valeur de courant, calculez la résistance de votre bicouche lipique . Connaissant sa surface et sachant que son épaisseur est de 100 nm, calculez également sa résistivité spécifique. Indiquez les valeurs de résistance et de résistivité spécifique dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- déstabilisez la membrane obtenue
- injectez 1 μl de la solution de gramicidine A 1 nM dans chaque compartiment
- reconstituez la membrane ($R_m \approx 100G\Omega$, $C_m \approx 200pF$)
- observez le courant traversant la bicouche ($\Delta V = \pm 120mV$, oscilloscope sur 100 mV/div et 500 ms/div, amplificateur sur gain 100 mV/pA et filtre passe-bas sur 16 Hz). Vous devriez pouvoir observer les variations de courant correspondants à l'ouverture et la fermeture des pores de gramicidine (fig. 3.12.B). Enregistrez le courant à l'aide de l'ordinateur et de l'interface NI USB 6008, pour cela utlisez l'application *nidatalogger* et choisissez une fréquence d'échantillonnage de 100 Hz. Vos mesures apparaitront sous forme d'un fichier Excel situé dans /Do-

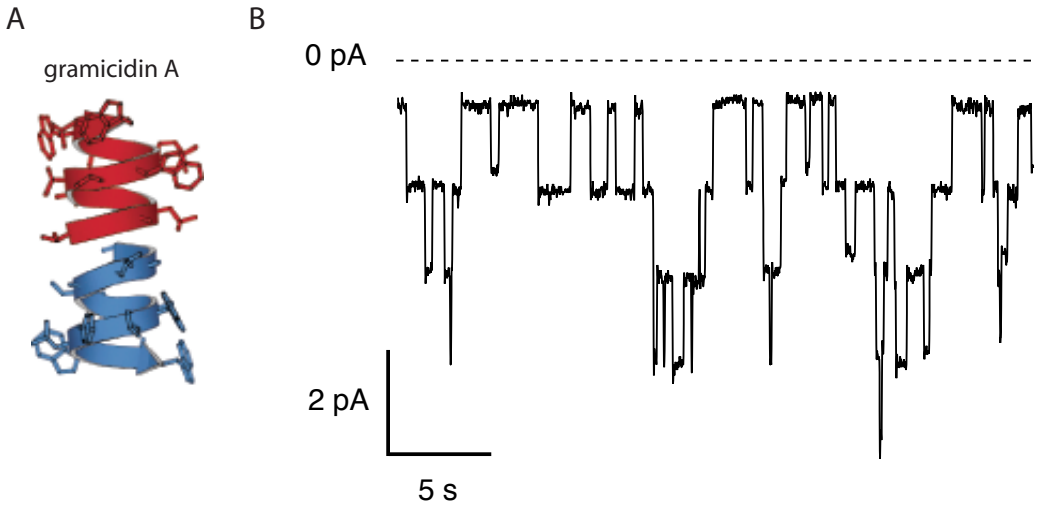


FIGURE 3.12 – La gramicidine A. (A) Dans une bicouche lipidique, les molécules de gramicidine A peuvent former des dimères qui constituent alors des canaux ioniques sélectif pour les ions monovalents positifs. (B) Variations de courant correspondant aux ouvertures et fermetures aléatoires de quatre canaux de gramicidine A dans la bicouche lipidique plane, observées à un potentiel imposé de -120 mV et en condition ionique symétrique (enregistrement réalisé par des étudiants lors de la séance)

---

cuments/LabView Data. Renommez ce fichier en `courantunitaire.xls`
- faites varier le potentiel transmembranaire et mesurez le courant unitaire. Indiquez l'intensité du courant unitaire et la conductance correspondante dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.
- Répétez la mesure en présence de d'un gradient de concentration de sodium (NaCl 1M / 0.1 M). Estimez le potentiel d'inversion du courant et indiquez cette valeur dans la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle.

3.4 Questions

Expliquez les points suivant dans le rapport :
- Pourquoi lorsque l'on impose une variation de potentiel triangulaire au circuit RC, on observe un courant correspondant à un signal carré ?

Expliquez en quoi l'amplitude de ce signal carré est lié à la valeur de la capacité du condensateur présent dans le circuit (remarque : l'amplificateur inverse le signal).
- Sachant que la capacité spécifique d'une bicouche lipidique est de l'ordre de 1 $\mu F/cm^2$, expliquez le calcul permettant d'estimer le rayon de la bicouche à partir du signal observé.
- Connaissant la résistance et la surface de la bicouche lipidique plane et sachant que son épaisseur est de 100 nm, expliquez le calcul permettant d'estimer sa résistivité spécifique.
- Comparez la valeur mesurée du potentiel d'inversion à la valeur théorique.

attention : joignez également vos fichiers de mesure de courants lors de la soumission du rapport et de la feuille de calcul. Vous devez donc déposer au minimum quatre fichiers dans Université Virtuelle (rapport, feuille de calcul, mesure de la capacité et mesure de la résistance de la bicouche lipidique).

Laboratoire IV : potentiels d'action

4.1 Introduction

L'objectif de cette séance est de vous permettre d'appréhender le modèle de Hodgkin et Huxley au travers de la réalisation de simulations numériques. Ces simulations illustrent l'approche expérimentale, basée sur la technique du potentiel imposé , qui est à la base de la compréhension du mécanisme permettant la génération des potentiels d'action. De plus, vous serez également amené a étudier les lois de l'excitation régissant l'apparition des potentiels d'action dans un axone.

4.1.1 Prérequis

Afin de préparer cette séance de travaux pratiques, vous devez revoir les sections § 4.5 et § 5.3 du syllabus.

4.1.2 Objectifs de la séance de laboratoire n°4

Les simulations numériques basées sur le modèle de Hodgkin-Huxley vont nous permettre :

- d'étudier les courants cellulaires dus aux canaux Na^+ et K^+ sensibles au potentiel, en potentiel imposé.
- d'étudier le comportement excitable de l'axone de calmar en mettant en évidence les lois régissant l'apparition des potentiels d'action.

4.2 Logiciel

Le logiciel libre NEURON est un environnement de simulation utilisé pour la modélisation théorique de neurones isolés et de réseaux neuronaux.

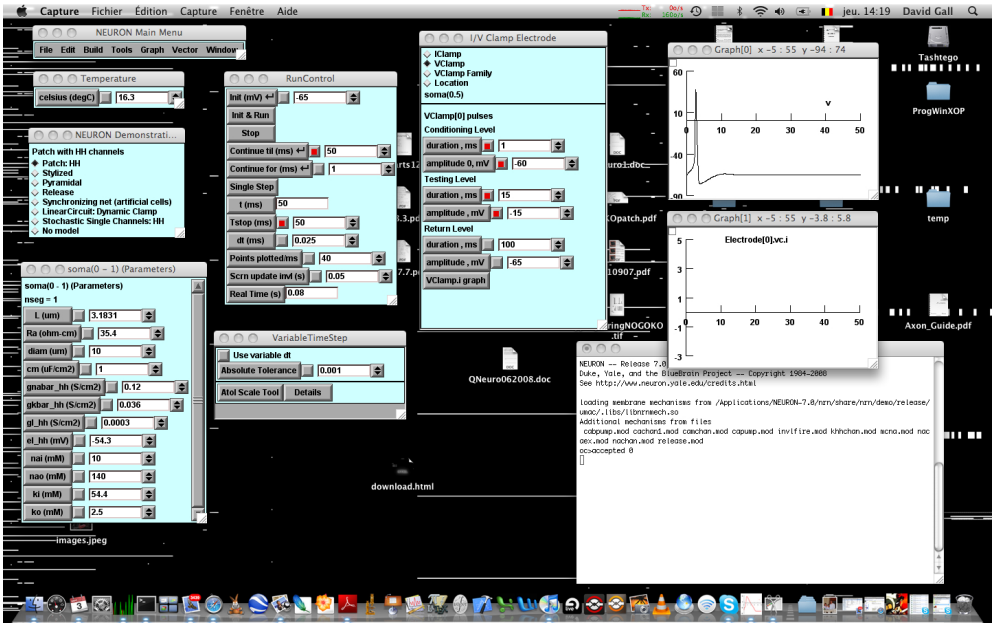


FIGURE 4.13 – L'interface graphique de l'environnement de simulation NEURON dans le cadre de la simulation du modèle de Hodglin & Huxley

Il peut être gratuitement téléchargé du site http ://www.neuron.yale.edu/ et fonctionne avec les systèmes d'exploitations les plus courants (MSWindows (98 et au delà), UNIX, Linux, et Mac OS X). Nous allons utiliser cet outil d'informatique afin d'étudier plus en détail la dynamique du modèle de Hodgkin et Huxley.

Pour démarrer le logiciel, cliquez sur l'icône "neurondemo" située dans le dock. Ensuite sélectionnez l'option "Patch HH" dans la fenêtre "NEURON Demonstrations". Enfin, dans la fenêtre "NEURON Main Menu", ouvrez le menu /Tools/Distributed Mechanisms/Viewers/Name Values et double-cliquez sur "soma". La fenêtre "soma(0-1) (Parameters)" apparaît alors.

Dans cette configuration, les fenêtres et options suivantes nous seront utiles :

- La fenêtre "NEURON Demonstrations" qui permet de sélectionner différentes types de simulations de démonstrations.
- La fenêtre "Temperature" qui permet de choisir la valeur de la température.
- La fenêtre "soma(0-1) (Parameters)" qui permet de modifier les paramètres du modèle de Hodgkin & Huxley. En particulier, les conductances maximales des canaux Na^+et K^+sensibles au potentiel (gnabar_hh et gkbar_hh), de la conductance de fuite (gl_hh) et les concentrations intra- et extracellulaires en Na^+et K^+(nai, nao,ki et ko).
- La fenêtre "RunControl" permet de lancer et de contrôler les simulations numériques. En particulier, le bouton "Init & Run" permet de démarrer l'intégration des équations du modèle. La valeur "Continue til (ms)" correspond au temps où la simulation s'arrête, la valeur "Tstop (ms)" contrôle l'affichage du résultat sur le graphique.
- La fenêtre "I/V Clamp Electrode" permet de choisir de simuler des mesures de courant en potentiel imposé ("VClamp") ou des mesures de potentiel en courant imposé ("IClamp").
- Les deux fenêtres graphiques vous donnent, respectivement, le courant et le potentiel membranaire. Vous pouvez effectuer des mesures directement sur les graphiques, en cliquant sur la trace, la valeur correspondante s'affiche alors dans la barre de titre de la fenêtre.

4.3 Simulations numériques

4.3.1 Etude des courants ioniques sensibles au potentiel par la technique du potentiel imposé

Pour réaliser des simulations d'expériences en potentiel imposé, choisissez "VClamp" dans la fenêtre "I/V Clamp Electrode". Vous avez alors accès

aux paramètres suivants :

- la durée et le potentiel du niveau de conditionnement (c-à-d avant le saut de potentiel)
- la durée et le potentiel du niveau test (c-à-d l'échelon de potentiel rectangulaire)
- la durée et le potentiel du niveau de retour (c-à-d après l'échelon de potentiel rectangulaire)

La température pour ces simulations est de $20^{\circ}C$. On vous demande réaliser les expériences suivantes :

- Mesure du courant membranaire suite à un saut de potentiel imposé de -65 mV à -130 mV et -65 mV à -0 mV, pour une durée de 15 ms.
- Mesure du courant membranaire suite à une série de sauts de potentiel imposé de potentiels croissants (partant de -70 mV et augmentant de 20 mV jusqu'à +90 mV). A l'aide de la feuille de travail Excel que vous avez téléchargé d'Université Virtuelle, réalisez un graphique comportant deux courbes courants-potentiels, donnant l'intensité du pic de courant entrant transitoire et du courant sortant soutenu en fonction du potentiel imposé.
- Mesure du courant membranaire suite à un saut de potentiel imposé de -65 mV à 0 mV dans la condition contrôle ($[Na]_{ext} = 140\ mM$) et dans une condition où le Na^+extracellulaire a été en grande partie substitué ($[Na]_{ext} = 14\ mM$).
- Mesure des conductances maximales de la membrane suite à une série de sauts de potentiel imposé de valeurs croissantes (partant de -70 mV et augmentant de 20 mV jusqu'à +90 mV) lorsque les canaux Na^+sensibles au potentiel et la conductance de fuite sont bloqués ($\bar{g}_{Na}$=0 S/cm^2 et $\bar{g}_l$=0 S/cm^2). Réalisez un graphique donnant la conductance maximale en fonction du potentiel imposé durant l'échelon rectangulaire.
- Mesure des conductances maximales de la membrane suite à une série de sauts de potentiel imposé de valeurs croissantes (partant de -70 mV et augmentant de 20 mV jusqu'à +90 mV) lorsque les canaux K^+sensibles au potentiel et la conductance de fuite sont bloqués ($\bar{g}_K$=0 S/cm^2 et $\bar{g}_l$=0 S/cm^2). Réalisez un graphique donnant la conductance maximale en fonction du potentiel imposé durant l'échelon rectangulaire.
- Mesure des conductances maximales de la membrane suite à une série de sauts de potentiel imposé à -15 mV, d'une durée de 5 ms, précédés de niveaux de conditionnement de potentiels croissants de même durée (partant de -75 mV et augmentant de 5 mV jusqu'à -40 mV) lorsque

les canaux K^+sensibles au potentiel et la conductance de fuite sont bloqués ($\bar{g}_K$=0 S/cm^2 et $\bar{g}_l$=0 S/cm^2). Réalisez un graphique donnant la conductance maximale en fonction du potentiel imposé durant le conditionnement.

4.3.2 Mise en évidence des lois de l'excitation nerveuse

Pour réaliser des simulations d'expériences liées à l'étude de l'excitabilité, choisissez "IClamp" dans la fenêtre "I/V Clamp Electrode". Vous avez alors accès aux paramètres suivants : le délai, la durée et l'intensité de l'échelon de courant injecté dans l'élément de membrane. La température pour ces simulations est de 16.3$^\circ C$. Les conductances doivent avoir leurs valeurs par défaut ($\bar{g}_{Na}$=0.12 S/cm^2, $\bar{g}_K$=0.036 S/cm^2 et $\bar{g}_l$=0.0003 S/cm^2).

On vous demande réaliser les simulations suivantes :

- Mesure du potentiel membranaire suite à l'injection d'échelons de courant de 150 ms d'intensité croissante, avec 5 ms de délai. Déterminez le seuil d'apparition des potentiels d'action (entre 0 nA à 0.05 nA de courant injecté) et réalisez un graphique donnant la fréquence des potentiel d'action en fonction de l'intensité du courant injecté.
- Mesure de l'amplitude d'un potentiel d'action suite à l'injection d'un échelon de courant de 150 ms à l'intensité seuil, dans la condition contrôle ($[Na]_{ext} = 140\ mM$) et dans une condition où le Na^+extracellulaire a été en grande partie substitué ($[Na]_{ext} = 14\ mM$).

Les lois de l'excitation nerveuse régissent l'apparition et la propagation des potentiels d'action. Ces lois font intervenir, notamment, les notions de rhéobase et de chronaxie. La mise en évidence de ces paramètres est l'objet de cet exercice. Ils sont définis comme suit :

Rhéobase : valeur minimale de l'intensité du stimulus électrique susceptible de provoquer l'apparition d'un potentiel d'action ; le stimulus étant un courant en échelon rectangulaire. Une fois établie dans des conditions données, cette valeur peut être utilisée comme échelon de mesure de l'intensité (cf. définition de la chronaxie).

Relation intensité-durée Si on applique des courants en échelon rectangulaire de durées variables. On constate que l'intensité de courant seuil diminue quand la durée de l'échelon rectangulaire stimulateur augmente et que le seuil d'apparition des potentiels d'action est atteint d'autant plus rapidement que l'intensité de l'échelon est grande.

– On vous demande de construire la **courbe intensité-durée** donnant la valeur de l'intensité de courant seuil en fonction de la durée de stimulation (réalisée avec 5 ms de délai). Cette courbe permet de déterminer un paramètre d'intérêt en physiologie : la **chronaxie**, qui est la durée minimale d'un échelon rectangulaire d'intensité double de le la rhéobase permettant l'apparition d'un potentiel d'action. L'intérêt de cette notion est qu'elle varie peu en fonction des conditions expérimentales et caractérise bien la vitesse de conduction d'une fibre (qui est d'environ 1 $cm/chronaxie$). La mesure de la chronaxie peut être réalisée en clinique afin de mettre en évidence des altérations de la conduction nerveuse.

4.4 Questions

Expliquez les points suivant dans le rapport :

– Commentez la différence entre les courants observés durant un saut de potentiel imposé de -65 mV à -130 mV et -65 mV à -0 mV.
– Commentez la différence entre les deux courbes courants-potentiels, donnant l'intensité du pic de courant entrant transitoire et du courant sortant soutenu en fonction du potentiel imposé.
– Expliquez l'effet de la substitution du Na^+extracellulaire sur le courant membranaire mesuré durant un saut de potentiel dépolarisant
– Expliquez le graphique donnant la conductance maximale, mesurée lorsque les canaux Na^+sensibles au potentiel sont bloqués, en fonction du potentiel imposé durant l'échelon rectangulaire. Quel mécanisme, présent dans le modèle de Hodgkin & Huxley, observe-t-on ?
– Expliquez le graphique donnant la conductance maximale, mesurée lorsque les canaux K^+sensibles au potentiel sont bloqués, en fonction du potentiel imposé durant l'échelon rectangulaire. Quel mécanisme, présent dans le modèle de Hodgkin & Huxley, observe-t-on ?
– Expliquez le graphique montrant les conductances maximales de la membrane suite à une série de sauts de potentiel imposé à -15 mV, précédés de niveaux de conditionnement de potentiels croissants, lorsque les canaux K^+sensibles au potentiel sont bloqués. Quel mécanisme, présent dans le modèle de Hodgkin & Huxley, observe-t-on ?
– Expliquez l'effet de la substition du Na^+extracellulaire sur l'amplitude des potentiels d'action.
– Expliquez en quoi la chronaxie dépend-elle des paramètres électriques passifs de la membrane de l'axone.